

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 A61K 31/70</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 95/11684</p> <p>(43) 国際公開日 1995年5月4日 (04.05.95)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01581 (22) 国際出願日 1993年10月29日 (29. 10. 93)</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 塩沢俊一 (SHIOZAWA, Shunichi) (JP/JP) 〒651-22 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio) 〒150 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>		
<p>(54) Title : ANTAGONISTIC INHIBITOR AGAINST MESENCHYMAL CELL GROWTH</p> <p>(54) 発明の名称 間葉系細胞の増殖拮抗阻害剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>An antagonistic inhibitor against mesenchymal cell growth, usable as a remedy for collagen diseases typified by rheumatoid arthritis and containing an AP-1 nucleotide comprising TGAGTCA or TGACTCA constituting a gene expression promoter.</p>		

(57) 要約

慢性関節リウマチをはじめとする膠原病の治療剤として、遺伝子発現プロモーターを構成するTGAGTCAまたはTGACTCAからなるAP-1ヌクレオチドを含有する間葉系細胞の増殖拮抗阻害剤を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
BB	バルバドス	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BE	ベルギー	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		

明 細 書

間 葉 系 細 胞 の 増 殖 拮 抗 阻 害 剤

技術分野

この発明は、間葉系細胞の増殖拮抗阻害相とこれを用いた膠原病の治療方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、特に、細胞増殖の引き金となるC-fosタンパクの遺伝子への結合を抑制し、リウマチの発症を防ぐのに有用な新しい治療剤とこれを用いた治療方法に関するものである。

背景技術

従来より、身体の結合組織の炎症を主病変とする疾患群を意味する膠原病は、全世界的にその病因の解明と治療が難しい難病として知られている。

この膠原病には、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、多発性筋炎、強皮症等が含まれるものと考えられてもいる。

全世界的に多くの研究が進められているものの、いまだに治療のための有効な手段が見出されていない現状にある。

たとえば 慢性関節リウマチ(RA)は人口の0.3%という多い罹患率であるにもかかわらず、その病因は未だ不明な、難病のひとつである。また、その治療も経験的な域を脱していないと言わねばならない程、これといった著効を示す治療薬が開発されていないのが現状である。このような現状は、現在の治療薬の開発が、必ずしも最先端の病因研究の成果を正しく踏まえてなされていないことにその原因の一端があるように思われる。

慢性関節リウマチは、各種の炎症性物質により関節の滑膜細胞の増殖が異常に亢進して関節を破壊するものであるが、従来の治療薬はこれら炎症物質(インターロイキン-1, 血管接着因子)等の阻

害という観点より研究・開発が行なわれてきたが、有効なものは得られていない。

ただ、これまでの研究により、慢性関節リウマチは、関節の炎症から関節の破壊、そして関節変形を示すものであり、病因は不明であるが、次のことが病態として明らかになっている。

- (1) 何らかの抗原（細菌やウイルス）が関節に到達して、関節の炎症を惹起する。
- (2) 関節炎が慢性化する。
- (3) 関節破壊に至る。

そして、(2)の慢性化の原因は、関節の滑膜細胞の異常な増殖亢進にある。

また、滑膜増殖の原因は滑膜細胞を刺激する物質（サイトカインなど）が増えていることと密接に関連していると考えられている。

現代のリウマチの病因研究と他の治療薬開発研究の中で位置付けてみると、慢性関節リウマチは、まず血中より関節滑膜に到達した未知の病原因子によって局所での免疫反応が開始され、ついで血中よりマクロファージ、T細胞、B細胞、好中球等が流入して複雑な慢性炎症が展開し、最後に関節破壊に至ると想定される。この過程に関与する重要な因子としては、まず抗原に対する特異応答の免疫記憶を担うT細胞とその支配下にあるB細胞といった特異的な認識系のほか、慢性炎症に広く関わるサイトカイン・接着分子、自己抗体（リウマチ因子）、蛋白分解酵素などの非特異的な系があり、従来の研究はこれらを抑制すべく展開されてきた。特に、最近ではサイトカインと接着分子の作用を抑制すべく世界の研究者が競合している。現在の研究から、確かにT細胞を中心とした免疫応答系は慢性関節リウマチの病因の重要な部分であろうが、少なくとも関節破壊に『直接』関わるのは、いわば非特異的な滑膜間葉系細胞である

ことが確実になっている。

この間葉系細胞への着目は、慢性関節リウマチだけでなく、膠原病そのものへの視点として注目されることである。

しかしながら、研究としては進展してはいるものの、残念ながら、いまだに慢性関節リウマチをはじめとする膠原病については、その有効な治療剤と治療方法が実現されていないのが実情である。

そこで、この発明は、以上の通りの従来技術の限界を克服し、慢性関節リウマチをはじめとする膠原病の治療に有効な新しい治療剤とこれを用いた治療方法を提供することを目的としている。

発明の開示

この発明は、上記の課題を解決するものとして、遺伝子発現プロモーターを構成するTGAGTCAまたはTGACTCAからなるAP-1ヌクレオチドを含有することを特徴とする間葉系細胞の増殖拮抗阻害剤を提供する。

また、この発明は、以上のAP-1ヌクレオチドを投与する慢性関節リウマチをはじめとする膠原病の治療方法をも提供する。

発明を実施するための最良の形態

上記のこの発明は、基本的には、滑膜間葉系細胞を抑制することによって関節破壊等の病因の発現を防ごうとするものである。すなわち、たとえば慢性関節リウマチについては、T細胞応答の、正確であっても複雑な蘂の中に入り込まず、直接関節破壊に関係のある滑膜間葉系細胞を抑制することによって治療を達成しようとするものである。このような考え方は、この発明の発明者による病因研究の結果を踏まえた独自のものであり、現在のところ世界に例のないものである。

さらに詳しく説明すると、慢性関節リウマチの関節病変には、免疫記憶を担う応答系の中心であるT細胞と、関節破壊に『直接』関

与する滑膜間葉系細胞 (Shiozawa et al. Ann. Rheum. Dis. 51 : 869, 1992) の二つが基本的に重要である。後者はパンヌスの主要構成要素であり、慢性関節リウマチの滑膜病変で重要な IL 1、IL 6、TNF α などのサイトカインを産生する (Shiozawa et al. Sem. Arthritis Rheum. 21 : 267, 1992)。パンヌスは一見腫瘍を思わせる増殖能を有するが、実際に、protooncogene の c - f o s 遺伝子を H - 2 promoter の下流域に組み換えて作成した H 2 - c - fos transgenic mice に実験関節炎 (antigen-induced arthritis) を惹起すると、リンパ球の局所への浸潤なしに、滑膜間葉系細胞のみによる関節破壊が誘導される (Shiozawa et al. J. Immunol. 148 : 3100, 1992)。

c - f o s 遺伝子は滑膜細胞に特有の形態変化 (dendritic cell から fibroblastic cell への変換) と増殖能を付与する (Kuroki, Shiozawa et al. J. Rheumatol. 20 : 422, 1993)。また、この c - f o s 遺伝子は慢性関節リウマチ滑膜に多量表出されており、骨芽細胞に transfection 法によりヒト c - f o s 遺伝子を持続発現せしめると、I 型 collagen の合成および mRNA 発現が抑制される (Kuroki, Shiozawa et al. BBRC 182 : 1389, 1992)。

このようなことは、c - f o s 遺伝子の過剰発現が、滑膜間葉系細胞の増殖を刺激して『直接』関節破壊に関わるのみならず、慢性関節リウマチの骨粗鬆症の原因としても関与し得る可能性を示唆している。

この発明は、このように、c - f o s 遺伝子は間葉系細胞を特に活性化するとの知見を踏まえ、その作用機序についての検討を踏まえてなされたものである。

すなわち、c - f o s 蛋白は、慢性関節リウマチ発症遺伝子のプ

ロモーターのAP-1部位に作用して遺伝子発現を調整することを前提としている。このプロモーターは、次式

5' - GTG TTA CCC TGA GTC AGA GGA GAA - 3'

3' - AAT GGG ACT CAG TCT CCT CTT GGG - 5

の構造を有し、AP-1部位は、このうちの下線部で示したTGA GTC Aを意味している。DNAは2本鎖であるが、蛋白質の合成に際しては片方だけが読まれ、この両方にc-fos蛋白質複合体が結合する。

そこで、この発明では、上記の通りの遺伝子発現プロモーターを構成するTGAGTCAまたはTGACTCAからなるAP-1ヌクレオチドを間葉系細胞増殖の拮抗阻害剤とする。

このことにより、慢性関節リウマチ等の発現は極めて有効に抑えられることになる。もちろん、上記AP-1ヌクレオチドは、各種の他の付加要件と組合せて使用してもよい。

以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明について説明する。

実施例

DBA1/J male mice皮下にFCAと共に200 μ gのII型コラーゲンを3週間間隔で2回免疫し、初回免疫後2週間後から週2回の割りで、一回5 μ gの2本鎖AP-1ヌクレオチドを腹腔内に投与した。対照には非特異2本鎖ヌクレオチドを用い、第2回免疫終了後3週間目に足関節の病理組織学的検索を行った。

その結果、Foot padの肥厚(> 3.7mm)は実験群で6/14例(43%)、対照群で12/16例(75%)。組織学的に著明な炎症細胞浸潤を認めた例が実験群で7/14例(50%)、対照群で8/16例(50%)。傷害のない関節炎を有した例が実験群で12/14例(86%)、対照群で2/16例(13%)であった。また、マウスの体重の変動は実験の前後で、実験群151%、対照

群 1 4 4 % と両者間に差を認めなかった。また、in vitro の滑膜培養系において、投与された A P - 1 は、A P - 1 サイトを介して作動する interleukin - 1 などの発現系を抑制したが、A P - 1 を介さない遺伝子発現系へは作用せず、その特異性が確認された。

以上の結果から明らかなように、投与された A P - 1 ヌクレオチドは、マウスのコラーゲンの関節炎における関節破壊を有意に抑制した。関節破壊の有意の抑制に対して、関節局所への炎症細胞浸潤の程度は両者で差がなかった。この結果は、関節炎においては浸潤してくる炎症細胞が必ずしも関節破壊に直接関与するものではないことを示しており、先の H 2 - c - f o s transgenic mice での関節破壊における滑膜間葉系細胞の役割りの結果と符合していて興味深い。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明した通り、この発明によって、膠原病、特に、慢性関節リウマチの治療が可能となり、臨床応用への期待は大きなものとなる。慢性関節リウマチの病因機序の解明や他の慢性炎症性疾患、あるいは間葉系細胞の増殖が病態に重要であるところの難治性疾患の病因解明と治療への応用が期待される。

請 求 の 範 囲

1. 遺伝子発現プロモーターを構成するTGAGTCAまたはTGACTCAからなるAP-1ヌクレオチドを含有することを特徴とする間葉系細胞の増殖拮抗阻害剤。
2. 請求項1の拮抗阻害剤からなる膠原病治療剤。
3. 請求項2の治療剤としての慢性関節リウマチ治療剤。
4. 請求項1の拮抗阻害剤を投与することを特徴とする膠原病の治療方法。
5. 請求項4の方法としての慢性関節リウマチの治療方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A61K31/70, C07H21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genetyx, Biosis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nucleic Acids Research; Vol. 21 (No. 11), P. 2715-21 (1993) T. Yoshida et. al. "Analysis of fra-2 Gene expression"	1-3
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 267 (No. 30), P. 21894-21900 (1992) J. Alam et. al., "Distal AP-1 Binding Sites Mediate Basal Level Enhansment and TPA Induction of the Mouse Heme Oxygenase-1 Gene"	1-3
A	WO, A, 91-6570 (University of Melbourne), May 16, 1991 (16. 05. 91) & AU, A, 90-66096	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 22, 1994 (22. 02. 94)

Date of mailing of the international search report

March 15, 1994 (15. 03. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01581

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 4, 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 4 and 5 pertain to methods for treatment of man or animals by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁵ A 61 K 31 / 70		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁵ A 61 K 31 / 70, C 07 H 21 / 00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
Genetyx, Biosis.		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nucleic Acids Research; vol. 21 (No 11), p. 2715-21 (1993) T. Yoshida et. al. "Analysis of fra-2 Gene expression"	1-3
A	The Journal of Biological Chemistry, vol. 267 (No 30), p. 21894-21900 (1992) J. Alam et. al., "Distal AP-1 Binding Sites Mediate Basal Level Enhancement and	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日
22.02.94		15.03.94
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 横 尾 俊 一 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	<p>TPA Induction of the Mouse Heme Oxygenase-1 Gene"</p> <p>WO, A, 91-6570 (University of Melbourne), 16. 5月. 1991 (16. 05. 91) & AU, A, 90-66096</p>	1-3

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4, 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、**人又は動物の治療方法である。**
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4（a）の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。